

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06945

研究課題名(和文)新規シナプス御機構：細胞外イオン濃度の活動依存的変化が果たす機能的役割の解明

研究課題名(英文)Synaptic activity dependent extracellular Ca dynamics regulates synaptic transmission

研究代表者

荒井 格 (Arai, Itaru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：00754631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小脳平行線維シナプスは局在するデルタ型グルタミン酸受容体(GluD2)にDセリンが結合することによって、小脳性運動学習に必須の長期抑圧(LTD)が生じる。GluD2の細胞外領域にはCa結合部位があり、Dセリンとの親和性に影響を及ぼす。この生理的意義について解析を行ったところ、Dセリン-GluD2シグナリングは、神経活動依存的なCa濃度の変化によって制御を受けており、Ca濃度の低下によってLTDが亢進し、更に小脳性運動学習も亢進する可能性が示唆された。すなわち、本研究により、シナプス活動依存性の細胞外イオン濃度変化というこれまでに無いシナプス伝達制御機構の存在が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系における情報処理の基本単位であるシナプスは活動に応じて様々に調節される。シナプス間隙のイオン濃度は活動に依存して変化するが、その機能については不明な点が多い。一方、近年シナプス分子にイオン結合部位があることが明らかになった。本研究は、小脳平行線維シナプスに局在するGluD2を介したDセリンによるLTD誘導をモデルとして、神経活動依存的な細胞外イオン動態がシナプス後部に発現する分子を介してシナプス伝達そのものに影響を及ぼし、最終的に個体行動レベルにまで影響するという、これまでに無い全く新しいシナプス伝達制御機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Delta2 glutamate receptor (GluD2) is localized at parallel fiber - Purkinje cell synapse in cerebellum and can trigger long term depression (LTD) by binding to D-serine. Recently it has been reported that GluD2 has Ca binding site at extracellular domain that has influence on its affinity to D-serine. To investigate its physiological significance, electrophysiological experiment and behavioral experiment were performed. As a result, it was found that Dserine - GluD2 signaling was influenced by [Ca]_o dynamics generated by synaptic activity at synapse level as well as behavioral level. Thus this study shed light on the new regulation mechanism for synaptic transmission; synaptic activity dependent extracellular ion dynamics can regulate synaptic transmission through post synaptic molecules that have the ion binding sites.

研究分野：神経生理学

キーワード：小脳 デルタ型グルタミン酸受容体 長期抑圧 平行線維シナプス 細胞外Ca濃度 小脳性運動学習 シナプス伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において、情報処理の基本単位は神経細胞と神経細胞をつなぐシナプスである。脊椎動物の興奮性シナプスはグルタミン酸受容体を介して情報伝達されるが、神経活動に応じて様々に調節される。例えば、神経活動が亢進すると情報伝達が長期にわたって増強されたり (LTP)、抑制されたり (LTD) する現象 (長期可塑性) が生じるが、これは記憶・学習の基盤であると考えられている。

神経活動が亢進すると、シナプス近傍の細胞外イオン濃度が一時的に変化することが古くから知られている。一方、近年グルタミン酸受容体の構造が明らかとなり、細胞外領域にイオン結合部位が存在することが明らかになった。しかし、神経活動亢進によるイオン濃度の変化が、このイオン結合部位を介してグルタミン酸受容体の機能にどのような影響を及ぼすのかについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

イオンチャネル型グルタミン酸受容体ファミリーに属する $\delta 2$ 型グルタミン酸受容体 (GluD2) は小脳平行線維—プルキンエ細胞シナプス (PF シナプス) に局在しているが、そのリガンドは長らく不明であった。近年、GluD2 は、シナプス活動の亢進時に PF シナプスを覆い囲んでいるバグマングリアから放出される D セリンと結合することにより、シナプス後細胞で AMPA 型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスを引き起こし、PF シナプスで LTD を誘発することが明らかとなった (D セリン LTD, Kakegawa et al., 2011)。更に近年、GluD2 の結晶構造が明らかとなり、リガンド結合領域 (LBD) の近傍に Ca^{2+} 結合部位が存在することが分かった (Hansen et al., 2009; Elegheert et al., 2016)。興味深いことに、*in vitro* の実験から GluD2 の D セリンに対する親和性は LBD 近傍の Ca^{2+} 結合部位を介して細胞外 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) に応じて低下することが報告された (Hansen et al., 2009)。一方、平行線維シナプスでは、神経活動が亢進するとシナプス近傍の $[\text{Ca}^{2+}]_o$ が低下することがすでに知られている。

これらの知見から、PF シナプスの活動が亢進すると、バグマングリアが D セリンを放出すると同時に、PF シナプス近傍の $[\text{Ca}^{2+}]_o$ が一過的に低下していることが予想される。すなわち、D セリン-GluD2 シグナリングが、活動依存的に変化した $[\text{Ca}^{2+}]_o$ によって制御を受けている可能性が考えられる。

そこで、本研究は D セリン-GluD2 シグナリングをモデルとして、PF シナプスにおける LTD を指標に、神経活動によって変化する $[\text{Ca}^{2+}]_o$ がどのようにシナプス伝達を制御するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) GluD2 の Ca^{2+} 結合能は、GluD2 の LBD 近傍に点変異を導入することで操作できることが既に報告されている (Hansen et al., 2009)。本研究では以前に文部科学省新学術領域研究の「先端モデル動物支援プラットフォーム」の支援を得て作製した変異型 GluD2 を持つ 2 種類のノックインマウス (KI マウス) を使用した。すなわち、①D782A の変異を導入して Ca^{2+} 結合能を欠落させた変異型 GluD2 を持つ KI マウス (sKI マウス) と、②E531C 及び D782C の変異を導入して Ca^{2+} が常時結合した状態を模倣した変異型 GluD2 を持つ KI マウス (dKI マウス) である。

(2) 電気生理学実験では、野生型及び (1) の KI マウスの小脳から急性スライス標本作製した。プルキンエ細胞にホールセルクランプ法を適用し、平行線維を電気刺激することで生じるシナプス電流応答 (PF-EPSC) を記録した。D セリン LTD は、小脳平行線維シナプスの活動亢進時に周囲を取り囲むバグマングリアから放出される D セリンが GluD2 に結合することで誘発される。本研究では D セリン LTD の誘発には、①D セリンの細胞外投与、②平行線維シナプスの高頻度刺激 (50 Hz で 10 回刺激を 0.1 Hz で 30 回繰り返す)、の 2 種類の方法を使い分けて行った。

(3) 行動学実験では、視機性眼球反応 (OKR) を用いた小脳性学習実験を実施した。マウスでは、D セリン LTD は、分解酵素 DAO (D アミノ酸酸化酵素) の発現の低い幼若期に顕著に見られる。しかし OKR 実験をより正確に行うには視覚機能が成熟した成獣マウスを使う必要がある。そこで、本研究では (1) の KI マウスに DAO 欠損したマウス (DAO KO マウス) と交配して作出したマウスを使用した (sKI/DAO マウス及び dKI/DAO マウス)。

4. 研究成果

(1) KI マウスを使った電気生理学実験

これまでの我々の研究から、D セリン-LTD は $[\text{Ca}^{2+}]_o$ に依存することが明らかになっている。すなわち、 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ を低下させると、D セリン-LTD は亢進し、上昇させると抑制する。この点について更に確かめるため、作製した KI マウスを使った電気生理学実験を行った。

まず、コントロール条件として、野生型マウスの小脳から急性スライス標本作製し、プルキン

エ細胞からホールセルクランプ法を適用した。分子層に置いた細胞外電気刺激用ピペットによって平行線維を刺激し、興奮性の PF シナプス応答を記録した。応答が安定した後、Dセリン (100 μ M) を灌流溶液に添加したところ、PF シナプス応答は約 10% 減衰した (Dセリン-LTD)。次に、同様の実験を Ca^{2+} 結合能が欠落した sKI マウスを使って行ったところ、PF シナプス応答は約 20% 減衰し、野生型に比べて Dセリン-LTD が亢進していることが分かった (図 1)。

Dセリン-LTD は PF シナプスを高頻度に刺激することでバグマングリアからの Dセリン放出を引き起こすことによっても生じる (Kakegawa et al. 2011)。DAO KO マウスの小脳から作製した急性スライス標本を使って PF シナプスを高頻度に刺激し Dセリン-LTD を誘導したところ、PF シナプス応答は約 23% 減弱した。一方、dKI/DAO マウスを使って同様の実験を行ったところ、Dセリン-LTD は約 10% の減弱に抑制された (図 2)。この結果は、PF シナプスを高頻度に刺激した結果、 $[Ca^{2+}]_i$ が一時的に低下したために DAO KO マウスでは GluD2 の Dセリンに対する親和性が上昇していたのが、dKI/DAO マウスではそれが見られなかったために生じたものであると考えられた。

以上の結果から、GluD2 の LBD 近傍にある Ca^{2+} 結合部位を介して、Dセリン-GluD2 シグナリングは $[Ca^{2+}]_i$ によって制御されていることが示唆された。

(2) KI マウスを使った行動実験

Dセリン-GluD2 シグナリングの $[Ca^{2+}]_i$ 依存性が個体の行動レベルに及ぼす影響を調べるため、小脳依存性の OKR を指標とする運動学習実験を行った。OKR は、動物の周りの視野が動くときに、網膜に写る外界の像がぶれないように眼が動く反射で有る。反応のゲインは小脳による運動学習によって高めることができるが、その際 PF シナプスにおける長期抑圧が必須であることが知られている。そこで、OKR を指標に、PF シナプスにおける Dセリン-LTD の $[Ca^{2+}]_i$ による制御が小脳性運動学習に果たす機能について検討した。

Dセリン-GluD2 シグナリングを抑制している dKI/DAO マウスを使った OKR 実験ではコントロールマウス (DAO KO マウス) を使った場合に比べて学習成績が低下する傾向が見られた。このことは、Dセリン-LTD の $[Ca^{2+}]_i$ による制御が小脳性運動学習に影響を及ぼすことを示唆している。

一方で、Dセリン-GluD2 シグナリングを亢進させている sKI/DAO マウスを使った OKR 実験では、DAO KO マウスを使った場合と比べて学習成績に差は見られなかった。これは、DAO KO マウスにおいて、既に十分量の Dセリンが放出されており、行動実験中の PF シナプスにおける $[Ca^{2+}]_i$ の低下によって生じる Dセリン-GluD2 シグナリングの亢進の効果が出にくい状況であった可能性が考えられた。

(3) シナプス間隙の $[Ca^{2+}]_i$ を制御する分子機構

一般にシナプスには、活動時に $[Ca^{2+}]_i$ に影響をあたえる様々な分子が発現している。例えば、シナプス前終末に発現する電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは、伝達物質放出をトリガーするが、活動電位の発生によって活性化して細胞内に Ca^{2+} を流入させるため、シナプス間隙の Ca^{2+} 濃度を活動依存的に低減させる可能性が考えられる。

そこで、野生型マウスを使い、Ca チャンネルを阻害したときに PF シナプスにおける LTD がどのような影響を受けるのかを検討した。

PF シナプスには P/Q 型、N 型、R 型の 3 種類の Ca チャンネルが発現していることが知られている。まず、N 型 Ca チャンネルを阻害したところ、PF シナプス応答は凡そ 20% 程度減弱した。しかし興

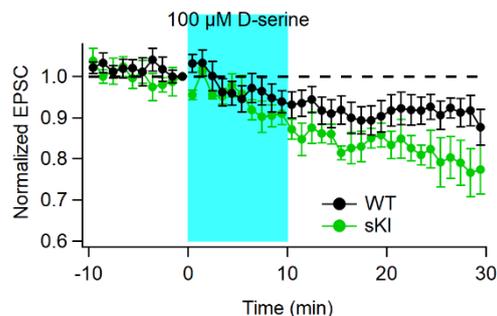


図 1 Dセリン LTD

Dセリンを投与すると、野生型では PF シナプス応答が減弱したが、sKI マウスではその亢進が見られた。

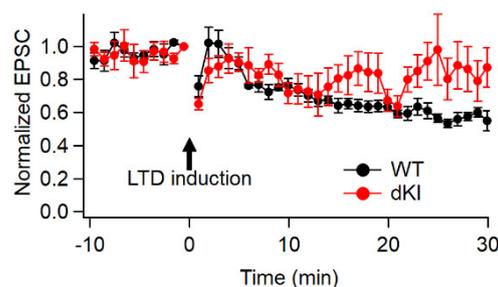


図 2 Dセリン LTD

PF シナプスの電気刺激によって Dセリン-LTD を誘導した。dKI マウスでは、LTD が抑制された。

味深いことに LTD の誘導には影響を及ぼさなかった。一方、R 型 Ca チャネルを阻害したところ、PF シナプス応答はほとんど減弱しなかったが、驚くべき事に LTD の誘導が有意に抑制された。これらの結果は、LTD 誘導のメカニズムがシナプス前終末の R 型 Ca チャネルの近傍に局在していることを示唆し、又それはシナプスの中心部というよりは周辺部に有ることを示唆している。先行研究より、GluD2KO マウスでは R 型 Ca チャネルの局在に異常が見られることを示唆する報告があり、シナプス前終末の R 型 Ca チャネルがシナプス後部の GluD2 の近傍に発現している可能性が考えられる (Yamashita et al.)。

以上の結果から、PF シナプスにおいてシナプス活動が亢進して LTD が誘導される際、GluD2 近傍に局在する R 型 Ca チャネルが活性化することによって $[Ca^{2+}]_i$ が低下し、これによって LTD の誘導が制御されている可能性が考えられた。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究は、小脳 PF シナプスの D セリン-GluD2 シグナリングをモデルとして、シナプス活動に依存して変化する $[Ca^{2+}]_i$ がシナプス後部に発現する分子 GluD2 の LBD 近傍に存在する Ca 結合部位を介して、LTD 誘導を制御する、というこれまでに無い全く新しいシナプス伝達の制御機構をシナプスレベルから行動レベルまで明らかにした。

シナプス活動によって変化するイオンは Ca^{2+} の他に K^+ や Cl^- 、 Na^+ も挙げられる。近年の結晶構造学の発展によりシナプスに発現する様々な分子の結晶構造が明らかになり、それらの中には細胞外領域にイオン結合部位を持つものがあることが明らかになりつつある。これらの分子についても、シナプス活動依存的に変化するイオン濃度によってその機能が制御を受けている可能性が考えられる。

すなわち、本研究の成果は、シナプス伝達一般における新しい制御機構の概念を創出に繋がることと期待される。

(5) 今後の展望

本研究によって PF シナプスにおける D セリン-GluD2 シグナリングが $[Ca^{2+}]_i$ の影響を受けることが明らかになった。今後、主に以下の点について更なる研究の進展が望まれる。

① $[Ca^{2+}]_i$ を制御する分子機構について

本研究により、D セリン-GluD2 シグナリングに影響を及ぼす、シナプス活動依存的な $[Ca^{2+}]_i$ の変化は R 型 Ca チャネルが担っている可能性が示唆された。しかし、R 型 Ca チャネルが GluD2 の近傍に局在しているかは不明である。そこで、今後 R 型 Ca チャネルと GluD2 の相対的な位置関係について、近年急速に技術発展を遂げている超解像度顕微鏡技術を使って明らかにする必要がある。

② シナプス活動依存的な $[Ca^{2+}]_i$ の変化の計測

PF シナプスにおいて、神経活動が亢進すると $[Ca^{2+}]_i$ が低下することは既に報告がある。しかし、シナプス間隙の Ca 濃度が一体どの程度低下するのか、定量的な解析は現在のところほとんど行われていない。そこでこの点について検討を進める必要がある。mM 程度の Ca^{2+} 濃度を計測できる Ca^{2+} 指示薬等を GluD2 等のシナプス分子に局在させ、シナプス活動によって生じる Ca^{2+} 濃度変化の検出を目指す。

③ 本研究成果の一般化

近年の結晶構造学の発展から、カイニン酸型グルタミン酸受容体、NMDA 型グルタミン酸受容体にもそれぞれイオン結合部位が存在することが明らかになった。これらのイオン結合部位がシナプス伝達においてどのような役割を担っているのか、又その役割が、活動依存的なイオン濃度の変化によってどのような影響を受けるのかを明らかにする必要がある。

引用文献

- ① Kakegawa W, Miyoshi Y, Hamase K, Matsuda S, Matsuda K, Kohda K, Emi K, Motohashi J, Konno R, Zaitzu K & Yuzaki M (2011)
“D-serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the $\delta 2$ glutamate receptor” *Nat Neurosci*, **14**: 603-611
- ② Hansen KB, Naur P, Kurtkaya NL, Kristensen AS, Gajhede M, Kastrop JS & Traynelis SF (2009)
“Modulation of the dimer interface at ionotropic glutamate-like receptor delta2 by D-serine and extracellular calcium” *J Neurosci*, **29**: 907-917
- ③ Elegheert J, Kakegawa W, Clay JE, Shanks NF, Behiels E, Matsuda K, Kohda K, Miura

E, Rossmann M, Mitakidis N, Motohashi J, Chang VT, Siebold C, Greger IH, Nakagawa T, Yuzaki M & Aricescu AR (2016)

“Structural basis for integration of GluD receptors within Synaptic organizer complexes” *Science*, **353**: 295-299

④ Yamashita M, Kawaguchi S, Hirano T (2013)

“Contribution of postsynaptic GluD2 to presynaptic R-type Ca²⁺ channel function, glutamate release and long-term potentiation at parallel fiber to Purkinje cell synapse” *Cerebellum*, **12**: 657-666

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松田 恵子 (Matsuda Keiko) (40383765)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関